

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01464

研究課題名（和文）薬剤耐性バイオリスク削減を目指したオゾン添加活性汚泥システムの開発

研究課題名（英文）Development of ozone-added activated sludge system for reduction of biorisk caused by antibiotic resistance microorganisms

研究代表者

西村 文武（NISHIMURA, Fumitake）

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：60283636

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：活性汚泥への直接オゾン適用には、近年注目されている薬剤耐性リスク（薬剤耐性菌（ARB）、薬剤耐性遺伝子（ARGs））削減にも効果が期待される。とりわけ、嫌気性消化プロセスを組み込む場合には、メタン発酵の促進と併せて、嫌気性条件による薬剤耐性リスク削減との相乗効果も期待できる。本研究では、オゾン添加による薬剤耐性リスク削減効果の定量化を行った。その結果、オゾン処理の設計・操作因子としては、単位固形物量当たりのオゾン消費量が重要であること、50から70 mgO₃/gTSのオゾン消費量で、大腸菌（非選択性と薬剤耐性双方）は全て定量限界以下まで不活化できることなどを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤耐性による健康リスクは、抗生物質の使用増大とともに高まり、その対応が希求されている。しかし、生活排水由来のリスク、畜産排泄物やそれを原料とした肥料等を通じてのリスクが指摘されている。現在の主流である生物学的処理法では、薬剤耐性遺伝子の水平伝播による耐性菌増加の可能性もあり、本リスク低減には限界もある。一方で、オゾン処理は代表的な物理化学的処理法であり、生物処理との併用で、種々の相乗効果が見込まれる。本研究により、薬剤耐性リスク削減にもオゾン処理は効果があることがわかり、生物処理と併せたシステム構築や必要な操作条件を明らかにした。関連リスク低減手法のひとつとして、その有効性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The direct application of ozone to activated sludge is expected to be effective in reducing the risk of Antibiotic resistance (Antibiotic-resistant bacteria (ARBs) and Antibiotic-resistance genes (ARGs)), which have attracted attention in recent years. In particular, when an anaerobic digestion process is incorporated, a synergistic effect with the reduction of Antibiotic resistance risk due to anaerobic conditions can be expected in addition to the promotion of methane fermentation. In this study, we quantified the effect of ozone addition on Antibiotic resistance risk reduction. The results showed that ozone consumption per unit solid volume is an important design and operating parameter for ozone treatment, and that *E. coli* (both nonselective and Antibiotic-resistant) can be inactivated to below the quantification limit at ozone consumption levels of 50 to 70 mgO₃/gTS.

研究分野：環境工学、水環境工学、污水处理

キーワード：薬剤耐性菌 薬剤耐性遺伝子 オゾン オゾン添加活性汚泥法 嫌気性消化 メタン発酵

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗菌薬は、病院や畜産業、水産業で多用され、結果として抗菌薬耐性菌(ARB)の出現を誘発している。2050年代には毎年1000万人が抗菌薬耐性感染症で死亡するとの予測もあり、その対策は喫緊の課題である。とりわけ畜産業では、家畜糞尿は肥料として農地に散布されるが、適切な処理がなされないと、薬剤耐性菌が環境中や農作物に残存し、生態系や人へのバイオリスクを著しく高めることになる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、従来より廃水処理システム安定化や汚泥減容、バイオガス発生促進効果等の利点があるとして開発されてきたオゾンの活性汚泥への直接添加法(オゾン添加活性汚泥法)を、その利点を活かしつつ同時に残存抗菌薬除去・薬剤耐性菌(ARB)および耐性遺伝子(ARG)の低減にも活用する、新規発想のバイオリスク低減型畜産廃棄物(家畜糞尿・廃水)プロセスとして活用することとし、その機序を明らかにするとともに、鍵となる設計操作因子の探索とその適切な範囲を示すことを目的とする。

3. 研究の方法

3.1 実験装置

実施した実験例として、ラボスケールにおける実験について示す。オゾン処理は、半回分式反応器を使用し、2Lの反応器に下水汚泥を投入し、オゾンガスを連続的に注入し反応させる。反応後、オゾンは二相分離器に通し、流出する可能性のある汚泥とオゾンを分離した後、ガスについてはオゾンの濃度を測定しオゾン分解器へ導入した。本研究では、オゾンの流入濃度と流量をそれぞれ15 mg/L、1 L/minに設定した。また、式(1)を用いてオゾンの総消費量を算出した。オゾン処理実験では、1から6時間の範囲でオゾンを注入処理した。オゾンと嫌気性消化を組み合わせた処理では、オゾンの処理時間は1から3時間に設定し、所定の時間ごとにサンプルを採取し、後続の分析に用いた。

$$M = \int_0^T (C_{in} - C_{out}) \frac{Q}{V} dt \quad \text{式(1)}$$

ここで、 M (mg/L)はオゾン総消費量を表し、 T (min)はオゾン反応時間を意味する。 C_{in} と C_{out} は、本研究における流入および流出のオゾン濃度(mg/L-gas)を表す。 Q (L-gas/min)はオゾンのガス流量を、 V は汚泥の体積(L)を指す。オゾン消費量(mg O₃/gTS)は、総消費量を汚泥の総固形物濃度(mg/L-TS)で割ることにより算出した。嫌気性消化にはAMPTSII Light (BPC Instruments, Sweden)を用いた。条件として、種汚泥と下水汚泥(未処理とオゾン処理済み)を体積比1:3で混合(総体積は900mL)した後、37°Cの環境で30日間の嫌気性消化を行った。さらに、嫌気性消化には半連続式の反応器を使用し、6日ごとに180 mLの下水汚泥を取り出し、新しい下水汚泥を注入して、汚泥の固形物滞留時間(SRT)を30日に設定した。

3.2 分析方法

大腸菌の測定とARGsの定量について、以下に示す。まず、大腸菌については、非選択性大腸菌と薬剤耐性大腸菌を測定した。1 mLの汚泥を12 mLのXM-G寒天培地と混合し、37°Cで18-22時間培養した後、30 CFUから300 CFUの範囲の各シャーレからサンプルを選定して計数した。薬剤耐性大腸菌の測定では、XM-G寒天培地にCLSIが定めたMIC (Minimum Inhibitory concentration)濃度の抗生物質を事前に加える点が異なる。ARGs及び遺伝子の測定には、FastDNA SPIN Kit for SoilでDNA抽出し、Thermal Cycler Dice® Real Time System III (TaKaRa Bio)を使用して、定量PCR (qPCR)で汚泥中に含まれる遺伝子の濃度(copies/gTS)を定量した。

4. 研究成果

図1に、オゾン処理時間と大腸菌、薬剤耐性遺伝子、及び16S rRNAの対数除去率の関連を示す。オゾン処理を2時間行った際(消費量:20から30 mg O₃/gTS)では大腸菌の除去率が1-logに達し、処理時間を4時間に延長(消費量は50から70 mg O₃/gTS)すると、除去率が2-logに達した。オゾン消費量が70 mg O₃/gTSを超えると、大腸菌(非選択性と薬剤耐性遺)の濃度は定量限界以下まで低下し、対数除去率は1.81から3.65-logに達した。処理時間が4時間を超えると、*sul1*、*sul2*、*tetA*、*ampC*の対数除去率はそれぞれ0.86-1.34、0.61-1.29、0.81-1.05、0.35-0.94 logになり、処理時間が6時間になると、これらのARGsの対数除去率はそれぞれ2.05-2.29、1.68-2.41、1.26-1.92、0.72-1.62 logに達した。本研究において、汚泥中のARGsを対数除去率1以上にするためには、オゾン消費量が50から70 mg O₃/gTSが必要であり、1.5から2-log以上に増加させるには、95 mg O₃/gTS以上のオゾン消費が必要であることが示された。大腸菌および抗生物質耐性大腸菌の結果と比較すると、同じオゾン消費量での細菌の除去率がARGsの除去率よりも高くなる傾向が確認された。これは、オゾンが最初に細胞膜を損傷させて細菌の感染力を奪い、その後で細胞内の耐性遺伝子が分解されるためと考えられた。

図2は、異なる処理方法による大腸菌の対数除去率(低[9±2 mgO₃/gTS]、中[14±1 mgO₃/gTS]、高[21±2 mgO₃/gTS]のオゾン消費量による単独処理、嫌気性消化 (AD)、及びそれらの組み合わせ処理)を示している。嫌気性消化のみでは、対数除去率が約 1.88 に達することが観察された。一方、オゾン前処理を行った、低消費量+嫌気性消化、中消費量+嫌気性消化、高消費量+嫌気性消化の組み合わせケースにおいては、それぞれ 3.05 と 2.69 の対数除去率が得られた。しかし、有機性廃棄物の堆肥化のための微生物基準に照らし合わせると、大腸菌の対数除去率が 2 を超える必要があるため、嫌気性消化のみでは、汚泥を農業堆肥として再利用するには不十分であることを示している。

図3は、異なるオゾン消費量による嫌気性消化日数別の *sul1* と *sul2* の濃度を示した。*sul1* はオゾン処理を増加させると減少する傾向が明らかになり、オゾン消費量に応じて増加し、それぞれ約 0.05、0.37、0.46 の対数除去率が得られた。*sul1* の最も顕著な減少は、嫌気性消化過程の最初の6日間に発生し、7.7倍、9.5倍、5.9倍、6.7倍に減少し、この期間に主に除去されることが示唆された。除去率を比較すると、単独の嫌気性消化過程では対数除去率が0.9に達したが、オゾン前処理を施した汚泥では、オゾン消費量に基づいて対数除去率が1.19、1.45、1.48に達し、より多くのオゾンを追加するほど *sul1* 遺伝子の除去が強化され、約 21 mgO₃/gTS のオゾン処理により、対数除去率を約 0.57 増加させることを示している。*sul2* において、前処理段階で遺伝子濃度の減少傾向が観察され、0.1 および 0.6 の対数除去率が達成された。しかし、18日後に *sul2* 遺伝子の存在量が増加し始めることが判明した。同様の現象は、これは他の研究でも報告されており、Wuらは、二段階嫌気性消化過程のメタン生成段階中に *sul2* 遺伝子の存在量が増加することを報告している。一方、オゾン処理したサンプルでは30日後に0.10、0.77、および0.63の対数除去率の減少が見られ、オゾン前処理を行うことで、嫌気性消化反応を継続する際の薬剤耐性遺伝子増加抑制効果があることが示された。

以上は、本研究での主要な成果の一部であるが、まとめると以下ようになる。
 1) オゾン処理の設計・操作因子としては、単位固形物量当たりのオゾン消費量が重要である。また、都市下水処理施設の活性汚泥を用いた実験では、50 から 70 mgO₃/gTS のオゾン消費量で、大腸菌(非選択性と薬剤耐性双方)は全て定量限界以下まで不活化できる。一方で、ARGs の対数除去率を1以上にするには、オゾン消費量を少なくとも 50 から 70 mgO₃/gTS 以上にすることが必要である。
 2) 単独の嫌気性消化処理では、大腸菌を定量限界以下まで減少させることができず(2を超えない)、肥料としての再利用において大腸菌の除去も不十分である。一方、オゾン前処理は初期の薬剤耐性遺伝子濃度に対して処理後の増加を防ぎ、オゾン消費量が増加すると除去率も向上し、オゾン消費量は 14±1 mgO₃/gTS 以上の消費で *sul1* および *sul2* の除去率を向上させうる。

オゾン添加により、活性汚泥は可溶化し、その後の嫌気性消化では、発酵効率(単位汚泥当たりのメタン発生量)が高くなることが示されており、オゾン添加のためのエネルギーは必要になるが、適用システムによるエネルギー回収とバイオリスク削減が見込まれ、ARB や ARG の制御

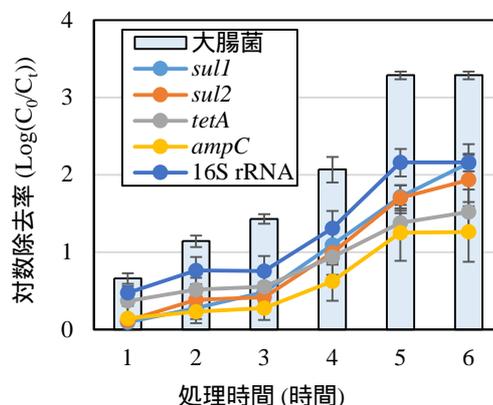


図1 オゾン処理時間と大腸菌、薬剤耐性遺伝子及び 16S rRNA の対数除去率の関係

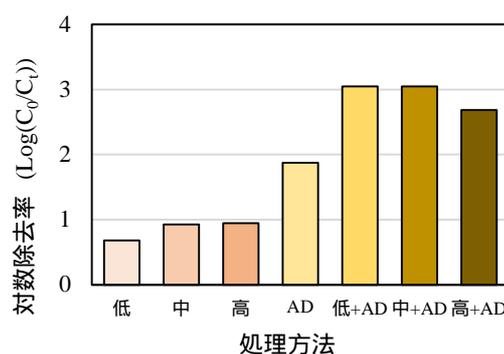


図2 処理方法と大腸菌の対数除去

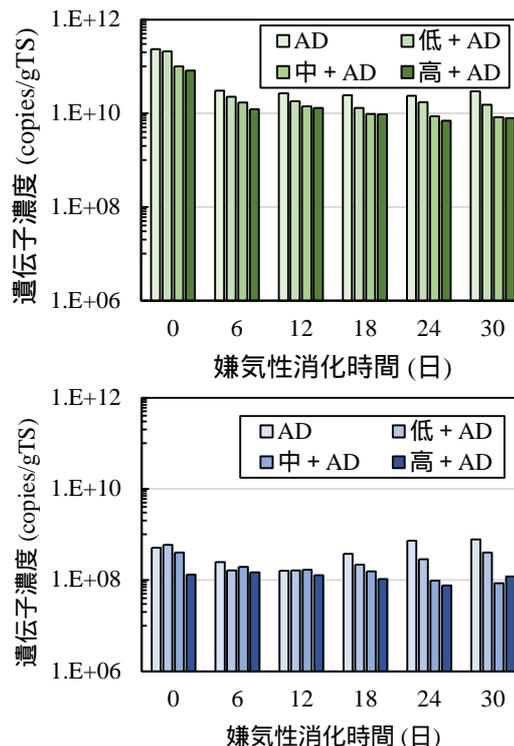


図3 異なるオゾン消費量による嫌気性消化日数別の *sul1*(上)と *sul2*(下) の遺伝子濃度

がより希求されていくであろう状況に対応できるシステムとして、オゾン添加活性汚泥法が位置づけられると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Im Dongbeom, Chen Yiren, Nishimura Fumitake	4. 巻 183
2. 論文標題 Effects of hydrothermal treatment on the reduction of antibiotic-resistant Escherichia coli and antibiotic resistance genes and the fertilizer potential of liquid product from cattle manure	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Waste Management	6. 最初と最後の頁 123 ~ 131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.wasman.2024.05.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Fenglong FAN, Fumitake NISHIMURA, Xian CAO, Osamu NISHIMURA
2. 発表標題 Removal characteristics of antibiotics resistance genes using bioelectrochemical system(BES)
3. 学会等名 第25回 日本水環境学会シンポジウム講演集, p.186, 2022.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 陳 奕人, Pham Minh Ngoc, 西村 文武, 井原 賢
2. 発表標題 牛ふん堆肥化の肥料効果と抗生物質耐性遺伝子低減に及ぼす熱加水分解前処理の影響
3. 学会等名 第22 回環境技術学会年次大会予稿集, pp.65-66, 2022.10.22.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Minh Ngoc PHAM, Fumitake NISHIMURA, Masaru IHARA, Ryota GOMI
2. 発表標題 Effect of moisture content on the removal rate of ARB and ARGs during cattle manure composting
3. 学会等名 The 3rd International Conference on Green Technology for Sustainable Environment 2022.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fenglong Fan, Mingdong Chang, Jia Miao, Haruaka Takeuchi, Dongbeom Im, Fumitake Nishimura, Xian Cao, Osamu Nishimura
2. 発表標題 Removal characteristics of antibiotics, antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARGs) in secondary effluent by Ozone-cathode microbial fuel cell(O-MFC)
3. 学会等名 第57回 日本水環境学会年会講演集, p.74, 2023.03.
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 K. Park, D. Kondo, B. Zhao, H. Wada, N. Nakada, F. Nishimura, M. Ihara, H. Tanaka
2. 発表標題 Evaluation of Ozonation on Removal Efficiency of Antibiotic Resistant Bacteria and Genes, and Chemical Indicators in Secondary Effluent at a Sewage Treatment Plant
3. 学会等名 The 58th Japan Annual Technical Conference on Swerage
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二瓶義明, 趙博, 藤田知功, 田中宏明, 西村文武, 井原賢
2. 発表標題 近畿地方の下水処理場での新型コロナウイルスRNA 調査
3. 学会等名 第56回 日本水環境学会年会講演集
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 範鳳龍, 林東範, 朴耿洙, 竹内悠, 西村修, 西村文武
2. 発表標題 オゾンカソード微生物燃料電池(O-MFC)による二次処理水中の抗生物質、抗生物質耐性菌、および抗生物質耐性遺伝子の除去過程におけるオゾンの効果
3. 学会等名 第32回 日本オゾン協会年次研究講演会 講演集
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 方盛鈞, 朴耿洙, 西村文武
2. 発表標題 活性汚泥の直接オゾン処理による薬剤耐性大腸菌および薬剤耐性遺伝子の除去効果に関する研究
3. 学会等名 第23回 環境技術学会年次大会研究発表会予稿集
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西村文武
2. 発表標題 家畜ふん尿処理利用・処理過程における抗生物質および抗生物質耐性菌に関わる研究動向
3. 学会等名 令和4年度家畜ふん尿処理利用研究会「家畜ふん尿処理利用過程における抗生物質および耐性菌に関わる研究動向」(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 方盛鈞, 朴耿洙, 林東範, 西村文武
2. 発表標題 オゾン可溶化処理による余剰汚泥中の薬剤耐性菌及び薬剤耐性遺伝子の除去効果の評価
3. 学会等名 第33回 日本オゾン協会年次研究講演会 講演集
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 方盛鈞, 朴耿洙, 林東範, 西村文武
2. 発表標題 余剰汚泥のオゾン可溶化処理による薬剤耐性菌及び薬剤耐性遺伝子の除去と嫌気性消化への影響
3. 学会等名 第46回京都大学環境衛生工学研究会シンポジウム
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 方盛鈞、朴耿洙、林東範、西村文武
2. 発表標題 オゾンを用いた余剰汚泥の可溶化処理による薬剤耐性の除去と嫌気性消化への影響
3. 学会等名 第61回下水道研究発表会 講演集
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 FANG, SHENG-CHUN, Park, Kyoungsoo, Im, Dongbeom, Nishimura, Fumitake
2. 発表標題 Removal of Antibiotic Resistant Bacteria and Antibiotic Resistance Genes as well as effects on microbial community and anaerobic digestion by ozone-based disintegration of excess sludge
3. 学会等名 2024 International Ozone Association Pan American Group(IOA-PAG) Conference
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中田 典秀 (NAKADA Norihide) (00391615)	神奈川大学・化学生命学部・准教授 (32702)	
研究分担者	井原 賢 (Masaru IHARA) (70450202)	高知大学・教育研究部自然科学系農学部門・准教授 (16401)	
研究分担者	竹内 悠 (TAKEUCHI Haruka) (70835272)	京都大学・工学研究科・助教 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------